



Hinc patriam sustinet

Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa

DETERMINAÇÃO DA RAZÃO ISOTÓPICA $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ POR ICP-MS NO SISTEMA SOLO-VINHO

Patrícia Alexandra Pardal Martins

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Sofia Cristina Gomes Catarino, investigadora auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Co-orientador: Raúl Filipe Xisto Bruno de Sousa, professor catedrático aposentado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Júri:

Presidente: Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, professor catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutor António Sérgio Curvelo Garcia, investigador coordenador aposentado do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária I.P.

Doutora Sofia Cristina Gomes Catarino, investigadora auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Lisboa, 2012

Este trabalho foi desenvolvido no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), Dois Portos, Unidade de Investigação de Viticultura e Enologia, sob a orientação da Doutora Sofia Catarino. Integra o projeto, financiado pela FCT, (PTDC/AGR-ALI/64655): "A composição multi-elementar e isotópica como marcadores da origem geográfica de vinhos" liderado pelo INIAV Dois Portos, e com a participação do Instituto Superior de Agronomia (Centro de Estudos Florestais e Unidade de Investigação em Química Ambiental) e das empresas vitivinícolas Companhia Agrícola do Sanguinhal Lda, José Maria da Fonseca Vinhos S.A. e Sogrape Vinhos, S.A.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais que tornaram possível a minha formação académica e sem a qual não teria chegado à realização desta dissertação. Quero agradecer-lhes também o apoio e os bons conselhos. Um agradecimento especial ao meu pai pelo encorajamento que sempre me deu.

Ao Pedro quero agradecer o carinho, o estímulo permanente, e também a sua paciência.

Um agradecimento especial à Bruna pelos, bolos e apoio informático, e também um agradecimento ao Flávio.

À minha orientadora Doutora Sofia Catarino, pelo rigor e partilha dos conhecimentos científicos, pelas críticas e pelas proveitosas e sábias sugestões. Tenho também a agradecer-lhe a paciência e amizade com que sempre me tratou. Obrigada!

Ao Engenheiro António Curvelo-Garcia, pela sua generosidade e apoio, e também pelos conselhos, comentários e sugestões.

Ao Professor Raúl Bruno de Sousa quero agradecer ter aceitado a orientação desta tese, pelos seus conselhos na fase inicial dos ensaios de cromatografia de troca-iónica, por me tranquilizar quando surgiram as primeiras dificuldades. Agradeço também a disponibilidade demonstrada.

À minha colega bolseira Marta de Sá quero agradecer-lhe a boa camaradagem e amizade.

À estagiária Mónica Assunção pela sua companhia e boa-disposição.

À técnica D. Otília Cerveira pela sua preciosa ajuda no laboratório, e também pela sua disponibilidade e simpatia.

À D. Edviges e à D. Irene pela boa disposição e alegria fazendo muitas vezes esquecer todos os problemas inerentes a este tipo de trabalho.

Aos colegas do INIAV-Dois Portos, pelos bons momentos de convívio e bom ambiente de trabalho.

RESUMO

Um dos maiores desafios respeitantes à autenticidade do vinho é o controlo da origem geográfica. Com base no pressuposto de que existe uma correlação entre a razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ do solo e do vinho, esta é apontada como um excelente marcador da sua origem geográfica.

Neste trabalho foi otimizado um protocolo analítico para a determinação da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ em amostras de solo por Q-ICP-MS, para distinguir solos de diferentes origens, e acompanhar a sua evolução ao longo do sistema solo-vinho. Devido à sobreposição isobárica do ^{87}Sr e do ^{87}Rb , Sr e Rb têm de ser separados antes da análise por ICP-MS. Para remoção do Rb foi otimizado um procedimento de separação por cromatografia de troca iónica, usando EDTA como eluente.

A medição da razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ do solo, para efeitos de comparação entre amostras, exige grande precisão instrumental. O método analítico otimizado apresenta uma precisão entre 0,1 e 0,2%, expressa em CVr.

Foi determinada a razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ dos solos de vinhas das Denominações de Origem Protegidas (DOP), Dão, Óbidos e Palmela. Foram observadas diferenças significativas entre solos das diferentes regiões. O solo proveniente da DOP Dão, desenvolvido sobre formações graníticas, apresentou $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ mais elevada, comparativamente com os restantes solos desenvolvidos sobre formações sedimentares.

Palavras chave: solo, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, origem geográfica, autenticidade

ABSTRACT

One of the most challenging matters regarding wine authenticity is the control of geographical provenance. The strontium isotope ratio $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ has been suggested to be a promising fingerprint for wine provenance identification. It is based on the assumption that there is a correlation between the ratio $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ of the wine and that of the soil in which the vine has grown. The aim of this study was to assess the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratios of vineyard soils from Portuguese DO and evaluate its suitability as a tool for provenance authentication.

It was optimized an analytical protocol for the determination of the isotopic ratio $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in soil-wine system by Q-ICP-MS. Due to isobaric overlap of ^{87}Sr and ^{87}Rb , Sr and Rb have to be separated prior Q-ICP-MS analysis. For an efficient removal of Rb a ion-exchange-chromatography procedure using chelating properties of EDTA was optimized.

ICP-MS instrumental parameters were optimized in order to obtain the best precision for the $^{86}\text{Sr}/^{87}\text{Sr}$ (0.1- 0.2% RSD).

The $^{86}\text{Sr}/^{87}\text{Sr}$ ratios of soils from vineyards located in three Portuguese DO (Dão, Óbidos and Palmela), were determined. Significant differences were found between soils of different DO regions. The soil from Dão DO, developed on granites, showed statistically higher $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ than other soils tested, developed on sedimentary formations.

Key-words: soil, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, geographical origin, authentication

EXTENDED ABSTRACT

One of the most challenging matters regarding wine authenticity is the control of geographical provenance. Many efforts have been made to identify potential markers and develop reliable analytical methods to determine the wine provenance authenticity. Within these fingerprints, isotope ratios have an increasingly important role. The strontium isotope ratio $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ has been suggested to be a promising fingerprint for wine provenance identification. It is based on the assumption that there is a correlation between the ratio $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ of the wine and that of the soil in which the vine was grown.

It was optimized an analytical protocol suitable for the determination of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in soil samples by Q-ICP-MS, with the required precision to evaluate how the isotope ratio is affected over the soil-wine system, and, to distinguish soils from different origins.

Due to isobaric overlap of ^{87}Sr and ^{87}Rb , Sr and Rb must be separated prior Q-ICP-MS analysis. In order to remove the Rb efficiently a separation ion exchange chromatography procedure using the chelating properties of EDTA, was employed. It is also required the sample mineralization which was carried by HPMW.

ICP-MS operating conditions and instrumental parameters were optimized, with the Sr isotopic standard, in order to obtain the best precision for $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ (0,1-0,2% RSD). The influence of the instrumental parameters: number of replicates, dwell time and number of sweeps per reading was studied. Mass bias correction was performed using the isotopic standard NIST SRM 987.

Soils samples were collected from four vineyards located in the three Portuguese DO, (Dão, Óbidos e Palmela). Two of the samples are from Óbidos region in the center, one from Dão region in northeast and one from Palmela region in the south/center. Significant differences were found between soils of the different DO regions. Soil from Dão DO, developed on granites, showed statistically higher $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ than other soils tested, developed on sedimentary formations. The Palmela DO soil show the lowest $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ and statistically has no similarities with any of the other regions. The soil of the two vineyards from Óbidos DO, have similar $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio measurements, and are significantly different from soils from Dão and Palmela region.

Key-words: soil, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, geographical origin, authentication

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

EXTENDED ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Autenticidade do vinho.....	3
2.2. Marcadores de origem geográfica.....	4
2.2.1. Composição multi-elementar.....	5
2.2.2. Perfis de terras raras.....	5
2.2.3. A composição isotópica.....	6
2.3. A razão isotópica do estrôncio no sistema solo-vinho.....	7
2.4. Técnica analítica de ICP-MS-Q.....	9
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
4. A RAZÃO ISOTÓPICA DE ESTRÔNCIO EM SOLOS DE VINHAS DE TRÊS DENOMINAÇÕES DE ORIGEM PROTEGIDA PORTUGUESAS.....	16
 ⁸⁷ SR/ ⁸⁶ SR RATIO IN VINEYARDS SOILS FROM PORTUGUESE DENOMINATIONS OF ORIGIN AND ITS POTENTIAL FOR PROVENANCE AUTHENTICATION	
4.1. Introduction.....	17
4.2. Material and methods.....	19
4.2.1. Vineyards.....	19
4.2.2. Soil sampling.....	20
4.2.3. Analytical procedures.....	21

4.2.4. Data Analysis.....	23
4.3. Results and discussion.....	23
4.3.1. Strontium from rubidium separation by ion exchange chromatography.....	23
4.3.2. Accuracy and precision of the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ measurements by ICP-MS	24
4.3.3. $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in soils from Portuguese Designations of Origins.....	25
4.4. Conclusions.....	27
4.5. Acknowledgments.....	28
4.6. References.....	29
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A importância da determinação da origem dos géneros alimentícios tem vindo a crescer devido aos efeitos da globalização dos mercados dos produtos alimentares e à crescente importação de produtos, o que faz com que os consumidores tenham um maior interesse no conhecimento da origem geográfica dos produtos que consomem.

Dentro dos géneros alimentares suscetíveis de adulteração encontra-se o vinho, cuja garantia da autenticidade assume grande importância na Europa onde a sua classificação está inequivocamente relacionada com a proveniência geográfica através das Denominações de Origem Protegida (DOP) e Indicações Geográficas Protegidas (IGP).

Na última década têm sido feitos grandes esforços para desenvolver metodologias analíticas fiáveis com vista à verificação da autenticidade do vinho no que diz respeito aos fatores que influenciam o seu valor, como, entre outros, a origem geográfica, ano de colheita, casta utilizada, e possíveis adulterações como a chaptalização e adição de água. Exemplo disso é a medição das razões isotópicas dos elementos estáveis hidrogénio (H), carbono (C) e oxigénio (O), que têm vindo a ganhar importância no controlo da origem e autenticidade no vinho. Em 1990 a União Europeia deu início à criação de um banco de dados - Wine Databank - de valores isotópicos, onde se incluem as razões $^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ dos vinhos provenientes dos países produtores dos Estados-Membros.

Quando se pretende relacionar o vinho com o solo da região onde está implantada a vinha é necessário selecionar parâmetros da composição do vinho que dependam inequivocamente da composição do solo, e sejam representativos da região de proveniência, não podendo ser afetados por práticas agrícolas e processos de vinificação. A razão isotópica de estrôncio ($^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$) tem sido apontada como um excelente marcador de origem geográfica de vinho (Horn *et al.*, 1992; Jakubowski *et al.*, 1999., Almeida e Vasconcelos, 2001; Barbaste *et al.*, 2002; Vorster, 2008). Inicialmente este marcador foi aplicado nas ciências geoquímicas para efeitos de datação e no estudo da origem das rochas e materiais geológicos. Esta abordagem baseia-se no facto de que os solos de diferentes regiões possuem diferentes razões isotópicas de Sr, ou seja têm uma “impressão digital” que é transmitida à videira e consequentemente essa poderá ser encontrada nos mosto e vinhos. Um dos quatro isótopos naturais do estrôncio é radiogénico; a sua abundância aumenta ao longo tempo devido ao decaimento radioativo do Rb. Esta variação nas abundâncias relativas dos isótopos do Sr pode ser usada para obter informação sobre a proveniência geográfica. Diversos estudos demonstram a importância da determinação da razão isotópica do estrôncio como marcador de origem geográfica de

vinhos (Horn *et al.*, 1992; Almeida e Vasconcelos, 2001; Barbaste *et al.*, 2002), uma vez que não sendo afetada pelo processo de vinificação e estando muito pouco sujeita a contaminações de origem antropogénica (Almeida e Vasconcelos, 2004).

A técnica instrumental utilizada para a determinação da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ é a espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo de quadropolo (ICP-MS-Q). Esta técnica apresenta uma precisão inferior quando comparada à espectrometria de massa de ionização térmica (TIMS), muito usada em matrizes geológicas, e, durante muito tempo considerada a mais adequada para a determinação de razões isotópicas. Na última década o ICP-MS tem sido alvo de estudos que têm demonstrado a sua adequabilidade com precisão suficiente, com coeficiente de variação 0,1 a 0,2%, para distinguir diferentes regiões geográficas, com a vantagem de ser uma técnica menos morosa, dispendiosa e de mais fácil aplicação em rotina quando comparada com o TIMS (Almeida e Vasconcelos, 2001; Vorster *et al.*, 2008). A aplicação da técnica de ICP-MS-Q à medição dos isótopos de estrôncio exige uma complexa preparação da amostra para evitar a ocorrência de sobreposição isobárica dos isótopos ^{87}Rb com ^{87}Sr , estrôncio e rubídio, sendo portanto necessário remover o Rb

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um protocolo analítico para a determinação das razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ por ICP-MS-Q em amostras de solos, mostos e vinhos, com a vista a avaliar a sua evolução ao longo do sistema solo-vinho e permitir distinguir vinhos de origens diferentes. Foram estudadas amostras de solo de quatro vinhas implantadas em três Denominações de Origem Protegidas, Dão, Óbidos, e Palmela.

O Sr foi separado do Rb para evitar a interferência da sobreposição isobárica, pela otimização de um procedimento de cromatografia de troca iónica com EDTA, da amostra previamente mineralizada. Este trabalho integra o projeto (PTDC/AGR-ALI/64655/2006), financiado pela FCT, "A composição multi-elementar e isotópica como marcadores da origem geográfica de vinhos", tem como grande objetivo a avaliação da composição multi-elementar, incluindo terras raras, e a razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, ao longo do processo produtivo: solos, uvas, mostos e vinhos originários de vinhas implantadas em quatro regiões vitivinícolas, e na identificação dos elementos que refletem a geoquímica do solo e seu potencial discriminatório para o estabelecimento de padrões regionais

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Autenticidade dos vinhos

O vinho devido ao seu impacto económico é um dos produtos alimentares mais estudados sobre o qual incide legislação muito específica que regula a sua produção e comercialização. A avaliação da sua autenticidade tem sido nos últimos anos uma preocupação crescente para as entidades reguladoras e de fiscalização.

A União Europeia (U.E.) ocupa uma posição de liderança no mercado mundial dos vinhos, contando com 55% da área plantada de vinhas, 60% da produção e 70% da exportação de vinho (Shelsier *et al.*, 2009). No contexto europeu a classificação do vinho está estreitamente relacionada com a proveniência geográfica. Essa relação é evidenciada na legislação pelo Regulamento (CE) N°479 /2008 (Comissão Europeia, 2008) onde se encontram estabelecidos os sistemas de proteção e valorização do vinho:

Denominação de origem: o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excepcionais, de um país em que o vinho cumpre as seguintes exigências: as suas qualidades e características devem-se essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os fatores naturais e humanos; as uvas a partir das quais é produzido provêm exclusivamente dessa área geográfica; a sua produção ocorre nessa área geográfica; é obtido a partir de castas pertencentes à espécie *Vitis vinífera*.

Indicação geográfica: uma indicação relativa a uma região, um local determinado ou, em casos excepcionais, um país, que serve para designar o vinho que cumpre as seguintes exigências: possui determinada qualidade, reputação ou outras características que podem ser atribuídas a essa origem geográfica; pelo menos 85% das uvas utilizadas para a sua produção provêm exclusivamente dessa área geográfica; a sua produção ocorre nessa área geográfica; é obtido a partir de castas pertencentes à espécie *Vitis vinífera* ou provenientes de um cruzamento entre esta e outra espécie do género *Vitis*.

A avaliação da autenticidade do vinho contempla vários aspetos, como o controlo da origem geográfica, as castas utilizadas e a pesquisa de adulterações, visando confirmar todas as declarações constantes no rótulo. Geralmente essa avaliação é realizada por controlo administrativo, avaliação dos principais parâmetros físico-químicos e por análise sensorial, que nem sempre é suficiente ou conclusivo. A pesquisa de adulterações e a verificação da origem com recurso a técnicas analíticas fiáveis é um objetivo há muito pretendido pelas entidades de controlo (Catarino *et al.*, 2011a; Shelsier *et al.*, 2009; Kelly *et al.*, 2005).

As práticas fraudulentas lesam economicamente o consumidor pondo a sua saúde em risco e representam sobretudo enormes prejuízos económicos para os produtores honestos que são alvo da concorrência desleal. Para além disso imagem do produto fica comprometida e os consumidores deixam de ter confiança. Como a qualidade do vinho é frequentemente associada pelos consumidores à sua proveniência, o benefício económico de toda uma região produtora de vinhos pode ser afetado.

2.2. Marcadores de origem geográfica

A utilização da composição elementar como marcador de origem geográfica para determinação da proveniência dos vinhos assenta no pressuposto de que o vinho reflete (pelo menos para parte dos elementos) a composição elementar do solo (Jakubowski *et al.*, 1999; Coetzee *et al.*, 2005).

A composição elementar dos vinhos de uma determinada região depende naturalmente do movimento dos elementos do leito rochoso para o solo e do solo para a planta. A meteorização da rocha-mãe e alterações climáticas influenciam a transferência dos elementos da rocha para o solo (Stewart *et al.*, 1998). A absorção dos elementos presentes no solo pelas plantas depende da sua bio-disponibilidade (Almeida e Vasconcelos, 2003a; Rummel *et al.*, 2010), casta (Almeida e Vasconcelos, 2003a), idade da planta, a profundidade a que se encontram as raízes, pH do solo, pluviosidade, temperatura e exposição solar (Greenough *et al.*, 1997).

Fontes antropogénicas de minerais, como a poluição, as práticas agrícolas e processos de vinificação alteram a composição dos elementos presentes no solo e no vinho comprometendo a relação do perfil da concentração dos elementos presentes no solo e no vinho (Almeida e Vasconcelos, 2003b; Catarino *et al.*, 2008).

Considerando os fatores mencionados têm sido explorados diferentes parâmetros, com vista à determinação da origem geográfica dos vinhos, tais como a composição mineral, perfil dos elementos terras raras e a composição isotópica (Jakubowski *et al.*, 1999; Almeida e Vasconcelos, 2003b; Catarino *et al.* 2011b). A análise de um único parâmetro pode revelar-se insuficiente para efeitos de avaliação da autenticidade, pelo que a combinação destes parâmetros aumenta o potencial discriminatório entre amostras de diferentes regiões (Suhaj *et al.*, 2005; Garcia-Ruiz *et al.*, 2007).

2.2.1. Composição multi- elementar

Os elementos minerais presentes no vinho refletem a sua origem geográfica, condições ambientais e percurso tecnológico. A determinação da composição multi-elementar em vinhos pode ser usada para obter informação sobre a sua origem e autenticidade.

De uma forma generalizada a classificação dos elementos minerais do vinho faz-se de acordo com a sua expressão quantitativa. Os elementos presentes em concentrações de 10 mg/L até 1000 mg/L, tais como Ca, K, Mg, Na, S, P e Cl são os elementos maioritários. Em concentrações de 0.1 mg/L e 10 mg/L estão presentes como elementos minoritários como os oligoelementos como Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Rb, Sr. Ao nível vestigial (<100 ug/L) encontram-se o Li, V, Cr, Co, Ni, Ga, As, Se, Cs, Ba, Pb, I e F e sub-vestigial (< 1ug/L) o Be, Cd, Sb, W, Hg, Tl, Bi, e U (Catarino, 2006).

A aplicação da análise da composição multi-elementar do vinho para determinação da sua origem geográfica, obriga à identificação e seleção dos elementos capazes de refletir a composição mineral de cada solo. Apenas alguns elementos têm potencial discriminatório pelo que é necessário uma cuidada seleção da combinação de elementos, que poderá diferir de região para região, tendo em consideração fatores climáticos processos tecnológicos e as potenciais fontes de contaminação que alteram os perfis mineralógicos do solo e do vinho (Suhaj *et al.*, 2005; Catarino *et al.*, 2011a)

2.2.2. Perfis de terras raras

O estudo dos perfis de concentração de elementos químicos do grupo dos lantanídeos (La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu) também conhecidos por elementos terras raras tem vindo a ser reconhecido como uma abordagem promissora à identificação da origem geográfica

Estes elementos possuem propriedades físico-químicas muito semelhantes e são absorvidos pelas raízes de forma não seletiva, por este motivo o seu perfil de distribuição no solo reproduz-se na videira e no vinho (Jakubowski *et al.*, 1999; Rossano *et al.*, 2007; Catarino *et al.*, 2011). Foi demonstrado que os elementos terras raras apresentam um padrão de distribuição de concentrações idêntica no solo, raízes folhas e uvas (Jakubowski *et al.*, 1999).

Apesar do potencial discriminante esta ferramenta tem como limitação a contaminação por processos de vinificação, nomeadamente a aplicação de bentonites usadas como agente clarificante (Jakubowski *et al.*, 1999)

Os perfis de concentração podem ser normalizados pelos valores do condrito de referência que contêm os elementos terras raras na sua proporção primitiva, podendo ser detetadas contaminações de origem antropogénica.

2.2.3. A composição isotópica

O termo “isótopo” (do grego *isos* mesmos e *topos* lugar) foi introduzido em 1913 por Soddy e Fleck e descreve a propriedade dos elementos que possuem diferentes massas mas ocupam o mesmo lugar na tabela periódica, pois têm a mesma estrutura eletrónica e o mesmo número de prótons, diferindo apenas no número de neutrões pelo que, a média das massas dos isótopos de um elemento constitui a sua massa atómica (Soddy, 1913).

Os elementos químicos ocorrem na natureza como uma mistura de dois ou mais isótopos estáveis, e, no caso dos elementos leves são comumente caracterizados por um isótopo, o mais leve, cuja abundância é muitíssimo mais elevada do que a do(s) restantes. No caso dos elementos pesados a relação entre o isótopo o mais leve e os isótopos mais pesados é mais equilibrada (Rossman., 2001; Berglund *et al.*, 2011).

As composições isotópicas dos elementos sofrem alterações devido a efeitos físico-químicos, ou seja atuam sobre elas fatores como a radioatividade natural, processos de fracionamento, interação com raios cósmicos e atividades antropogénicas. Estas alterações das abundâncias relativas quando mensuráveis e sistemáticas podem ser usadas para obter informação sobre a origem e o percurso de materiais biológicos, bioquímicos e geológicos (Rossman, 2007; Ferreira, 2008).

Os isótopos estão presentes na natureza e a sua distribuição natural reflete o percurso dos processos físicos e biológicos. Nos seres vivos variam de acordo com fatores geológicos, climáticos e ecológicos. A razão dos isótopos de um elemento específico que os organismos absorvem do ambiente deixa neles uma marca característica do ambiente onde se desenvolveram (Rossman, 2001; Ferreira, 2008).

A determinação de isótopos estáveis de H, C, N, O e S, e mais recentemente dos elementos pesados Sr e Pb tem vindo a ser usada como ferramenta no estudo de proveniência e autenticidade de géneros alimentícios entre os quais o vinho. A composição isotópica dos elementos H e O nas plantas refletem a composição da água assimilada. A variação na razão isotópica destes elementos está dependente das condições climáticas e geográficas, pelos efeitos de altitude, latitude e distância do mar, em que os processos típicos do ciclo hidrológico de evaporação e condensação conferem uma “impressão digital” isotópica. Também a variação da razão isotópica do S nas plantas está relacionada com a geologia do solo e com sua a distância do mar pelo que fornece informação sobre a

proveniência mas tem o inconveniente de ser afetada por contaminação devido a operações culturais e à poluição. Informação sobre práticas agrícolas e discriminação do tipo e vias fotossintéticas são fornecidas respetivamente pela variação dos isótopos N e C. (Kelly *et al.*, 2005; Rossman, 2007; Rummel *et al.*, 2010). As razões isotópicas de $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ são largamente aplicadas combinadas na identificação da origem geográfica e botânica do etanol do vinho.

A composição isotópica de alguns elementos pesados, como o Sr e Pb, baseia-se na variação da abundância um ou mais do que um isótopo formado(s) naturalmente em resultado do decaimento radioativo de um outro elemento. A composição isotópica destes elementos varia de acordo com concentração inicial dos isótopos originais, constituintes da composição isotópica primordial da Terra, e dos isótopos filhos (radiogénicos), que sofrem um enriquecimento ao longo do tempo devido a essas transmutações nucleares. A relação entre a concentração do elemento do isótopo original e o elemento filho é específico dos diferentes materiais geológicos e apenas se altera pela mistura com o mesmo elemento mas de diferente composição isotópica, pelo que proporcionam informação sobre a origem geográfica. (Faure, 1977; Horn *et al.*, 1998; Balcaen *et al.*, 2010, Rummel *et al.*, 2010).

O pré-requisito para a aplicação da análise isotópica é o conhecimento das variações das razões isotópicas dos elementos estáveis que ocorrem naturalmente, e conhecimento básico dos mecanismos de fracionamento de isótopos na natureza.

2.3. A razão isotópica do estrôncio no sistema solo-vinho

O estrôncio é um elemento do grupo IIA, um metal alcalino terroso que possui quatro isótopos naturais. Os isótopos ^{84}Sr , ^{86}Sr , e ^{88}Sr ocorrem nos materiais terrestres em proporções relativas constantes, o isótopo ^{87}Sr é enriquecido gradualmente ao longo do tempo devido ao β decaimento do ^{87}Rb , ($T_{1/2} = 48,8 \times 10^9$ anos). A proporção absoluta de ^{87}Sr relativamente aos outros isótopos de Sr (convencionalmente ao ^{86}Sr) varia de acordo com a composição e idade geológica. Esta variação permite obter informação sobre a idade geológica dos materiais geológicos e consequentemente sobre localização geográfica, pois diferentes tipos de formações geológicas possuem razões isotópicas distintas de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, contudo nem sempre únicas (Capo *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 1998).

Numa primeira aproximação, as rochas mais antigas possuem a razão isotópica de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ mais elevada, devido ao decaimento prolongado do ^{87}Rb . Rochas com elevado conteúdo em Rb apresentam uma maior razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ quando comparadas com rochas com concentração inferior de Rb. Os valores da razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ são mais elevados para rochas mais antigas como o granito, e pelo contrário, rochas tais como os

basaltos oceânicos apresentam os mais baixos valores de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ pois são também as rochas mais recentes (Faure, 1977; Capo *et al.*, 1998; Stewart *et al.*, 1998; Rosner, 2008).

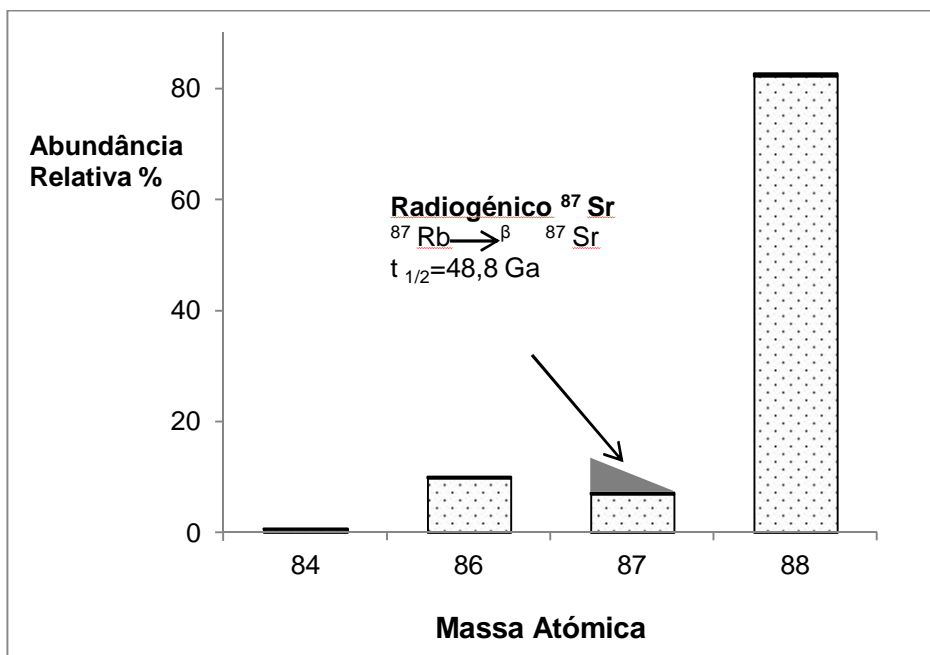


Figura 1: Abundâncias relativas do estrôncio. A variação da abundância relativa do estrôncio deve-se ao decaimento radioativo do rubídio

A meteorização do leito rochoso ou de sedimentos é a mais importante fonte de Sr no solo, não obstante, importa considerar outras fontes como a precipitação, deposição de poeiras e de natureza antropogénica (Capo *et al.*, 1998).

De acordo com a sua biodisponibilidade, o estrôncio é absorvido pelas plantas sem que se verifiquem fenómenos de fracionamento (Horn *et al.*, 1992) pelo que a razão isotópica característica do solo é encontrada nas uvas, mostos e vinhos (Horn *et al.*, 1992; Almeida e Vasconcelos, 2001; Barbaste *et al.*, 2001).

O aumento da concentração de Sr ao longo do processo de vinificação das uvas tintas é referido na literatura (Almeida e Vasconcelos, 2004; Catarino *et al.*, 2006). Não se verificando contaminação durante esta etapa, o aumento da concentração de Sr pode ser explicado pela acumulação deste elemento nas grainhas (Bertoldi *et al.*, 2011) e cuja transferência para o vinho é potenciada pela maceração dos componentes sólidos da uva. No caso dos vinhos brancos o aumento da concentração de Sr não é tão evidente devido à ausência desta etapa (Catarino *et al.*, 2006). Apesar da vinificação afetar a concentração total de Sr, na ausência de contaminação, a razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ do vinho continua a refletir a que existe no solo onde a planta se desenvolve.

2.4. A técnica analítica de ICP-MS-Q

Nos últimos anos a aplicação da técnica de espectrometria de massa com acoplamento de plasma induzido, ICP-MS, tem sido explorada na determinação da razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ com o propósito de distinguir a origem geográfica. (Vanhaecke *et al.*, 1999; Almeida e Vasconcelos, 2001; Barbaste *et al.*, 2001; Balcaen *et al.*, 2010).

O princípio básico da técnica de ICP-MS é a utilização da energia fornecida pelo plasma para promover a ionização da amostra para análise no espectrómetro de massa onde os iões são separados em função da sua razão massa/carga sob ação de campos eletromagnéticos. Os iões de interesse são conduzidos até ao detetor onde são convertidos num sinal elétrico mensurável.

A maioria dos elementos possui mais do que um isótopo, e, no plasma são gerados iões positivos de cada isótopo, que originam diferentes espectros de massa, sendo portanto possível análise da composição isotópica dos elementos com o ICP-MS.

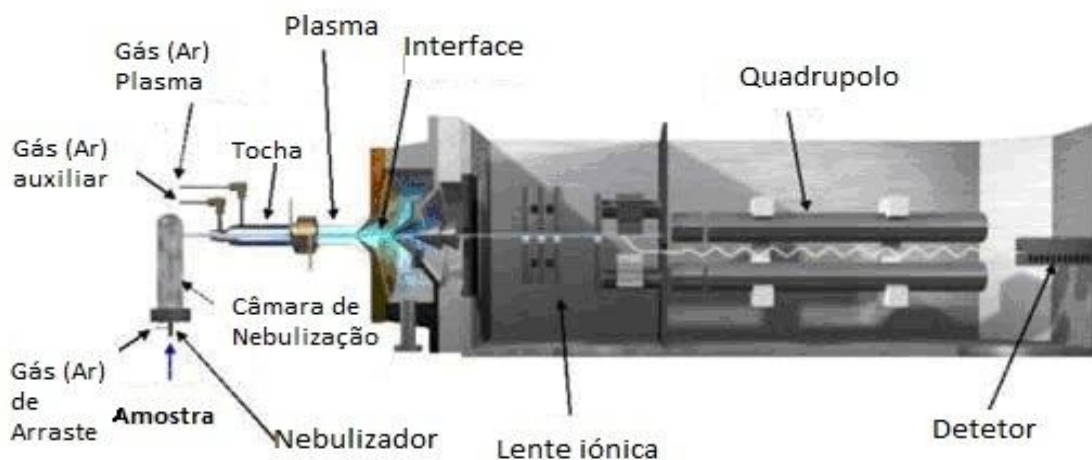


Figura 1. Representação esquemática dos principais componentes do ICP-MS-Q

O equipamento usado neste trabalho é um ICP-MS equipado com analisador de massas de quadrupolo à semelhança da representação apresentada na figura 1. Os componentes e o percurso da amostra no ICP-MS-Q serão seguidamente explicados.

Introdução da amostra:

A amostra no estado líquido é aspirada por uma bomba peristáltica para o nebulizador, onde é convertida em aerossol. O nebulizador utilizado é do tipo *cross flow*. A formação do aerossol dá-se pela ação pneumática de um de fluxo de argon (1 L/min) direcionado num ângulo preciso de modo a cruzar com a amostra que entra no nebulizador através do tubo capilar. Na câmara de nebulização as partículas de maior dimensão são retidas e eliminadas, permitindo apenas a passagem de partículas de menor dimensão para serem conduzidas através do injetor à base do plasma. Depois da passagem pela câmara de nebulização somente 1-2% da amostra chega ao plasma.

Zona do Plasma:

Os componentes necessários para formar o plasma são a tocha, radiofrequência (RF) e a bobina de RF. A tocha consiste em dois tubos de quartzo concêntricos onde o argon circula. A envolver a extremidade da tocha está uma bobina de cobre que está ligada à fonte de RF. O fluxo de gás principal fornece o argon para formação do plasma, flui a um caudal de 15 L/min entre os dois tubos da tocha. O plasma é gerado pela interação do argon com o campo eletromagnético criado pela RF aplicada à bobina. A temperatura do plasma atinge aproximadamente os 7000 °C. O fluxo de gás do nebulizador (1 L/min) transporta a amostra através do injetor, que se localiza no interior da tocha, até à base do plasma. Enquanto atravessa o plasma, a amostra vai sofrendo mudanças físicas extremas; primeiro a dessolvatação, seguindo-se a vaporização, atomização até à ionização. Os iões formados deixam a zona de plasma e entram na zona da interface.

Interface:

A função da interface é assegurar que a passagem dos iões provenientes da zona do plasma que se encontra à pressão atmosférica (760 Torr), para o espectrómetro de massa que opera em alto vácuo (1×10^{-6} Torr) seja eficiente. A zona de interface é arrefecida devido à alta temperatura do plasma e é mantida a uma pressão de cerca de 4 Torr, aqui são alojados dois cones de níquel; o cone de amostragem, e o cone *skimmer*, ambos possuem um orifício no vértice. É através destes cones que se faz a passagem dos iões entre a zona do plasma para o espectrómetro. Os iões passam pelo orifício com 1,1 mm de diâmetro do cone de amostragem e daqui para o cone *skimmer* cujo orifício é inferior com 0,9 mm de diâmetro. Esta ação restringe o fluxo de gases que inicialmente parte da zona do plasma.

Sistema de focagem de íões:

O sistema de focagem de íões - lente iónica - consiste numa série de lentes electroestáticas que se localizam entre o cone *skimmer* e o analisador de massas. A sua função é criar um feixe de íões e dirigi-lo desde a zona de plasma, passando pela interface até ao analisador. A lente iónica impede que fotões, espécies neutras e espécies de carga negativa cheguem ao analisador de modo a evitar interferências e ruído de fundo.

Analisador de massas-Quadrupolo:

Na câmara de alto vácuo o feixe de íões é focalizado para o analisador de massas quadrupolar para que os íões sejam separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). O analisador de quadrupolo consiste em quatro barras com igual comprimento e diâmetro onde é aplicada de uma combinação entre potenciais de corrente direta e de radiofrequência de modo a gerar um campo magnético que permite a trajetória estável somente de íões de determinada m/z . Desta forma pode-se selecionar os íões e dirigi-los até ao detetor. Os íões com diferentes m/z irão colidir com as barras sendo neutralizados e assim removidos.

Detetor:

Depois de separados pelo analisador os íões irão colidir na superfície de um detetor para serem convertidos num sinal elétrico mensurável. A superfície ativa do detetor do tipo multiplicador de íões, dínodo, liberta um eletrão sempre que um ião colide, por sua vez este eletrão volta a colidir no dínodo seguinte e assim sucessivamente, dando assim início ao sistema de amplificação do sinal até ser suficiente para ser mensurável.

3. Referências bibliográficas

Almeida C.M., Vasconcelos M.T.S.D., 2001. ICP-MS determination of strontium isotope ratio in wine in order to be used as fingerprint of its regional origin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16, 607-611.

Almeida C.M., Vasconcelos M.T.S.D., 2003a. Multi-element composition and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ of wines and their potentialities as fingerprints of wine provenance. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 18 (1), 15-27.

Almeida C.M., Vasconcelos M.T.S.D., 2003b. Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4788–4798.

Almeida C.M., Vasconcelos M.T.S.D., 2004. Does winemaking process does influence the wine $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$? A case study. *Food Chemistry*, 85, 7-12.

Balcaen L., Moens F., Vanhaecke F., 2010. Determination of isotope ratios of metals (and metalloids) by means of inductively coupled plasma-mass spectrometry for provenancing purposes-A review. *Spectrochimica Acta Part B*, 65, 769-786.

Barbaste M., Robinson K., Guilfoyle S., Medina B., Lobinski R., 2002. Precise determination of the strontium isotope ratios in wine by inductively coupled plasma sector field multicollector mass spectrometry (ICP-SF-MC-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17 (2), 135-137.

Berglund M., Wieser M., 2011. Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 83 (2), 397-410.

Bertoldi D., Larcher R., Bertamini M., Otto S., Conchieri G., Nicolini G., 2011. Accumulation and distribution pattern of macro- and microelements and trace elements in *vitis vinifera* L. Cv. Chardonnay berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7224-7236.

Capo R.C., Stewart B.W., Cadwick O.A., 1998. Strontium isotopes tracers of ecosystems processes: theory and methods. *Geoderma*, 82, 197-225.

Catarino S., 2006. Metais contaminantes nos vinhos. Ocorrência por influência das bentonites. Tese de doutoramento, Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Catarino S., Capelo J.L., Curvelo-Garcia A. S., Bruno de Sousa R., 2006a. Evaluation of contaminant elements in portuguese wines and original musts by high intensity focused ultrasound combined with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 40 (2), 91-101.

Catarino S., Madeira M., Monteiro M., Trancoso I., Martins P., Curvelo-Garcia A. S., Bruno de Sousa R., 2011a. Determinação da origem geográfica do vinho com base da sua elementar. *Enologia*, 57/58, 3-10.

Catarino S., Trancoso I.M, Madeira M., Monteiro F., Bruno de Sousa R., Curvelo-Garcia A.S., 2011b. Rare earths data for geographical origin assignment of wine: a Portuguese case study. *Bulletin de l'OIV*, 84 (965-967), 223-246.

Coetzee P., Steffens F., Eiselen R., Augustin P., Balcaen L., Vannhecke F., 2005. Multielement analysis of South African wines by ICP-MS and their classification according to geographical origin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 5060-5066.

Comissão Europeia. 2008. Regulamento (CE) n.º 479/2008 do Conselho de 29 de Abril de 2008 que estabelece a organização comum do mercado vitivinícola que altera os regulamentos (CE) n.º 1493/2003, (CE) n.º 1290/2005, (CE) n.º 3/2008. Jornal Oficial da União Europeia.

Faure, G., 1977. Principles of Isotope Geology. Wiley, New York

Ferreira A.I.J., 2008. Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Garcia-Ruiz S., Moldovan M., Alonso I., 2007. Measurement of strontium isotope ratios by MC-ICP-MS after online Rb-Sr ion chromatography separation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 84-93.

Greenhough J., Longerich H., Jackson S., 1997. Element fingerprint of Okanagan Valley wines using ICP-MS: Relationships between wine composition, vineyard and wine color. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3, 75-83

Horn P., Shaaf P., Holbach B., Hölz S., Eschnauer H., 1992. $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ from rock and soil and vine and wine. *Z Lebensm Unters Forsh*, 196, 407-409.

Horn P., Hölz S., Todt W., Matthies D., 1998. Isotope abundance ratios of Sr in wine provenance determinations, in a tree-root activity study, and of Pb in a pollution study on tree-rings. *Isotopes in Environmental Health Studies*, 33:1-2, 31-42.

Jakubowski N., Brandt R., Stuewer D., Eschnauer H.R., Görtes S., 1999. Analysis of wines by ICP-MS: Is the pattern of rare earths elements a reliable fingerprint for provenance?. *Journal of Analytical Chemistry*, 364, 424-428.

Kelly S., Heaton K., Hoogwerff J., 2005. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 555-567.

Nier A. O., 1950. A Redetermination of the Relative Abundances of the Isotopes of Carbon, Nitrogen, Oxygen, Argon, and Potassium. *Physics Review*. 77, 789-793.

Rossano E., Zoltán S., Malorni A., Pocsfalvi G., 2007. Influence of winemaking practices on the concentration of rare earth elements in wines studied by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 311-317.

Rossmann A., 2001. Determination of stable isotope ratios in food analysis. *Food Reviews International*, 17(3), 347-381.

Rossmann A., 2007. Stable isotopes databases for European food products. Proceedings of the international workshop "Fingerprints methods for the identification of timber origins" Bonn, Germany.

Rosner M., 2010. Geochemical and instrumental fundamentals for accurate and precise strontium isotope data of food samples: Comment on "Determination of the strontium

isotope ratio by ICP-MS gingeng as a tracer of regional origin” (Choi et al, 2008). *Food Chemistry*, 121, 918-921.

Rummel S., Hoelz S., Horn P., Rossman A., Schlicht C., 2008. The combination of stable isotope abundance ratios of H, C, N and S with $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ for geographical origin assignment of orange juices. *Food Chemistry*, 118, 890-900.

Soddy F., 1913. Intra Atomic Charge. *Nature*, 92, 399–400.

Shelsier K., Fauhl-Hassek C., Fiorina M., Cotea V., Kocsi E., Schoula R., Jaarsveld F., Wittkowski R., 2009. Characterization and determination of the geographical origin of wine. Part 1: overview. *European Food Research and Technology*., 230, 1-13.

Stewart B., Capo R., Chadwick O., 1998. Quantitative strontium isotope models for weathering, pedogenesis and biogeochemical cycling. *Geoderma*, 82, 173-195.

Suhaj M., Korenovská M., 2005. Application of elemental analysis for identification of wine origin: a review. *Acta Alimentaria*, 34 (4), 393-401.

Vanhaecke F., Wannemacker G., Moens L., Hertogen J., 1999. The determination of isotope ratios by means of quadropole-based ICP-mass spectrometry: a geochronological case study. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, 1691-1696.

Vorster C., 2008. Precise $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotope ratio measurements by quadropole-based ICP-MS after ion-exchange separation of Rb for provenance determination on agricultural products. Master Thesis, Faculty of Science of the University of Johannesburg.

4. A RAZÃO ISOTÓPICA DE ESTRÔNCIO EM SOLOS DE VINHAS DE TRÊS DENOMINAÇÕES DE ORIGEM PROTEGIDA PORTUGUESAS

$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ RATIO IN VINEYARD SOILS FROM PORTUGUESE DENOMINATIONS OF ORIGIN AND ITS POTENTIAL FOR PROVENANCE AUTHENTICATION

P. Martins^{1,3}, M. Madeira², F. Monteiro², R. Bruno De Sousa³, A.S. Curvelo-Garcia¹, S. Catarino^{1,3,*}

¹Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. / Unidade de Investigação de Viticultura e Enologia, 2565-191 Dois Portos, Portugal. ²CEF - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal. ³UIQA - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, Portugal.

Abstract

Background and Aims: One of the most challenging matters regarding wine authenticity is the control of geographical provenance. The aim of this study was to assess the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratios of vineyard soils from Portuguese DO and evaluate its suitability as a tool for provenance authentication. An analytical protocol for the determination of the isotopic ratio $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in soil-wine system by Q-ICP-MS was optimized.

Methods and Results: For Rb removal and Sr separation an ion-exchange-chromatography procedure using EDTA was optimized. ICP-MS instrumental parameters were optimized in order to obtain the best precision for the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ (0.1- 0.2% RSD). The $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratios of soils from four vineyards located in three Portuguese DO (Dão, Óbidos and Palmela), established in distinct soil types, were determined. Significant differences were found between soils of different DO regions. Soil from Dão DO, developed on granites, showed statistically higher $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ than other soils tested, developed on sedimentary formations.

Conclusions: The optimized analytical protocol for $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ determination in soil wine-system by Q-ICP-MS showed sufficient precision and accuracy to differentiate variations of the isotopic abundance in soil samples. The $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio may represent a suitable fingerprint for the studied DO.

Significance of the Study: This study highlights the relevance of setting up an international databank of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ values, aiming to be used as tool for geographic identification and authentication. In addition, it provides an increase in knowledge on the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ of Portuguese vineyards.

Keywords: soil-wine system, $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, geographical origin

Australian Journal of Grape and Wine Research (artigo submetido)

4.1. Introduction

The food markets are globalized, which has generated a growing concern of consumers regarding the origin and quality of products. The provenance of foodstuff is regarded as an additional information and warranty of their quality and authenticity. The geographical provenance of the wine has a direct effect on its quality and commercial value. The specification of the geographic origin in the labels is obligatory in wine of Origin Denomination (DO) and the veracity of this information has to be guaranteed. Attempted fraud follows the market of prestige wines and because of its economic impact, wine is one of the products most studied in terms of food authentication, (Barbaste et al. 2002, Almeida & Vasconcelos 2003).

The control of wine geographical origin from its chemical composition is one the most challenging issues in terms of wine authenticity. In the last decade many efforts have been made to identify potential markers and develop reliable analytical methods to determine the wine provenance authenticity. Within these fingerprints, isotope ratios have an increasingly important role (Almeida & Vasconcelos 2001, Barbaste 2001 Ferreira 2008, Rosner 2008). The application of techniques for the determination of isotopic ratios of light stable isotopes (H, C, N, O, S) to verify the authenticity and fraud detection have been developed and introduced since the last two decades. The isotopic ratios of light elements provide information on climate, distance from the sea, altitude, latitude, and technological practices (Ferreira, 2008).

More recently the study of isotopic ratios of heavy elements such as lead and strontium came into use in this field of application providing additional information on the geographical origin, since the isotopic signature of these elements are inherited by plants from the geological and pedological environment (Horn et al. 1992, Barbaste 2001, Rummel et al. 2008). The isotopic composition of strontium is widely used in the earth sciences to discriminate between different geologic terrains. Studies demonstrated a suitable application to trace the geographical origin of food and it has been increasingly used.

Strontium has four naturally occurring stable isotopes with ranges of natural abundance variations as follows: ^{84}Sr , 0.55-0.58%; ^{86}Sr , 9.75-9.99%; ^{87}Sr , 6.94 - 7.14% and ^{88}Sr , 82.29-82.77% (Berglund & Wieser 2011). Isotopes ^{84}Sr , ^{86}Sr and ^{88}Sr occur in constant relative proportions, while ^{87}Sr gradually increases in minerals due to the radioactive β -decay of the ^{87}Rb isotope. Differences in the relative abundance of ^{87}Sr vary with geological ages and consequently with geographical locations, providing a fingerprint for different rock types (Capo et al. 1998, Vanhaecke et al. 1999, Almeida & Vasconcelos 2001). The

proportion of ^{87}Sr to total Sr increases at a rate dependent on the available Rb. Geologic environments rich in Rb relative to Sr will have an increase in the ratio $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, while regions with low Rb/Sr ratios will retain low values of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ for long periods of geologic time. As a result, the isotopic composition of Sr present in a geological sample depends on both the Rb/Sr concentration ratio and the age of the material. Weathering of the underlying rock or sediments is a significant source of strontium to soil. Pre-Cambrian granitic bedrock and alluvial sands derived from felsic rocks show high $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ (0.710-0.716) that reflects the age of continental crust and high Rb/Sr in which these materials have origin. Limestones have intermediated $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio values (0.706-0.709) and young oceanic basalts and their sediments have the lowest values (0.702-0.705) (Faure 1977, Capo et al 1998). Biological processes concerning plant metabolism do not significantly fractionate strontium isotopes. It has been demonstrated that mass fractionation has negligible effect on the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ isotope ratio. Elements are uptaken by the plants at the same isotopic proportions in which they occur in an available form in soil. Therefore plants reflect the environment of growth: bedrock, soil and soil water (Horn et al. 1992, Capo et al. 1998, Stewart et al. 1998), being necessary, however, to consider all sources of Sr in soil available to plants: natural (bedrock weathering, precipitation), and anthropogenic (e.g. fertilizers). To establish correlations of the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ between wine and soils, a deep knowledge of the geological and pedological of the region is a prerequisite. Studies by Horn et al. (1998) demonstrated that the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio of several wines was within the respective ranges for rocks and respective soils. In the cases in which the isotopic ratio values were inconsistent with their origin, it was found out by double-blind studies that wines were falsely declared. Barbaste et al. (2001) reported values of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio in wine in agreement with the literature data for the corresponding soils. Also Almeida and Vasconcelos (2004) have studied the isotopic composition of strontium in two different wines from the Douro Portuguese DO by means of quadropole-ICP-MS (Q-ICP-MS) and compared it with the isotopic composition of the provenance soil and the grape juice. It was shown that the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ values in the soil, grape and wine, were statistically identical. Precise and accurate Sr isotope data is required for the origin discrimination. To determine the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio of food, faraday equipped multi collector TIMS or ICP-MS are the techniques of choice, with precision values of 0.002% (RSD) (Barbaste et al. 2002, Rosner 2009). The lower precision of Q-ICP-MS, typically below 0.1 % (RSD), can be a limiting factor, especially in studies involving samples with very close $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$. Nevertheless, Q-ICP-MS is robust and less time consuming and proved to be suitable to distinguish the Sr isotopic composition of wines (Vanhaecke et al. 1999, Almeida & Vasconcelos 2001). Due to isobaric overlap of ^{87}Sr and ^{87}Rb , Sr and Rb have to be separated prior Q-ICP-MS

analysis. An effective Rb/Sr separation is pre-requisite for the accurate determination of Sr isotope ratios. In order to carry out this separation, ion exchange chromatography is employed and a variety of elution procedures are describe in literature. The most commonly used chromatographic separation procedure involves the elution of Rb with a weak HCl solution, followed by the elution of Sr using a stronger HCl solution (Vanhaecke et al. 1999). An alternative approach to the conventional HCl method is the use of a two - step chromatographic separation as described by Almeida and Vasconcelos (2001). A highly specific separation method using a complexing agent-ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA), that chelates all cations except the alkali-metals, therefore it forms strong chelates with Sr without interacting with Rb and it remains on the column until elution with HNO_3 (Vorster et al. 2008). Scarce data is available for isotopic composition of Portuguese vineyards and no information is known concerning different DO. Therefore, within a research program (Multi-elemental and isotopic composition as fingerprints of wine geographical origin), regarding strategies for wine fingerprinting, a study was developed to investigate whether the variation in Sr isotopic composition from region to region could be used as a tool for traceability of Portuguese DO (Dão, Óbidos and Palmela), where soils are developed on different geological formations. For that, an analytical protocol suitable for the determination of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ by Q-ICP-MS in vineyards soil samples, grape must and wine was optimized, Sr being separated from Rb by cation exchange chromatography using EDTA.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Vineyards

The four studied vineyards located in three Portuguese DO (Dão, Óbidos and Palmela) are presented in Figure 1. In the DO Dão (Central Portugal), a vineyard was considered: Quinta dos Carvalhais (40° 33' N, 7° 47' W), Sogrape Vinhos. It is established in dystic Cambisols and dystic Regosols (sensu WRB, 2006). Soils are developed on monzonitic granites (Hercynian granites), the most representative geological formation of Dão DO (Teixeira et al., 1961). In the DO Óbidos (Centre of Portugal), characterized by a larger variety of lithological formations, two vineyards were considered: Quinta do Sanguinhal (39° 15' N, 9° 09' W) and Quinta de S. Francisco (39° 11' N, 9° 10' W), both of Companhia Agrícola do Sanguinhal. Quinta do Sanguinhal is established in soils (dystic Regosols) developed on Jurassic sandstones; Quinta de S. Francisco is established in soils (eutric Regosols) developed on Cretacic sandstones (Zbyszewsky and Ferreira, 1966). In the DO Palmela (Southern of Portugal), a vineyard was considered: Vinha de Algeruz (38° 34' N, 8° 49' W),

José Maria da Fonseca Vinhos. This vineyard is installed in an area of eutric Regosols developed on Pliocenic sedimentary formations (clays and sands), being the most representative geological formation of Palmela DO (Manuppella et al., 1999).



Figure 1. Vineyards location

The area of each vineyard plot, year of planting, rootstock, vine spacing, row direction and training system are indicated in Table 1. All the vineyards have the same red variety in production (*Vitis vinifera* L., cv Aragonez).

The climate is temperate, of the Mediterranean type, characterized by a dry summer and wet autumn/winter/early spring. In vineyards Quinta dos Carvalhais, Quinta do Sanguinhal and Quinta de S. Francisco the climate is humid temperate with dry summer and cold nights (Csb, Köppen classification). The vineyard Vinha de Algeruz the climate is under humid temperate with dry hot summer, with temperate nights (Csa, Köppen classification) (2012, www.meteo.pt).

4.2.2. Soil sampling

Soil sampling took place at December 2007 (Vinha de Algeruz, Quinta do Sanguinhal e Quinta de S. Francisco) and May 2009 (Quinta dos Carvalhais). In each vineyard soil samples were collected (with a probe) from nine sampling sites, representative of the vineyard entire area, and from four depth layers: 0-20, 20-40, 40-60 and 60-80 cm. The

samples used in this study were those collected at the 40-60 cm layer, where the root density was higher.

Soil samples were dried at room temperature, ground and then passed through a 2 mm sieve (<270 mesh).

4.2.3. Analytical procedures

Sample mineralization

Prior to the ion-exchange chromatographic separation of Sr and Rb the samples were treated in order to eliminate the organic matter. High pressure microwave (HPMW) was employed. A subsample of 0.20 g of dried soil was mineralized by High Pressure Microwave (HPMV) digestion, with concentrated 4 mL HNO_3 and 4 mL HF, using a CEM MDS2000 apparatus. The digestion program consisted in one step of 30 min at 630 W. The samples were diluted to 25 mL with ultrapure water. The efficiency of the digestion procedure was confirmed by Certified Reference Material (Geo PT 25, Basalt HTB-1). To avoid contamination of the samples, all polyethylene material were immersed for least 24 hours in 20% (v/v) HNO_3 and then rinsed thoroughly with ultrapure water before use. Only purified water (conductivity < 0.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$) was used.

Strontium from rubidium separation by ion exchange chromatography

The ion exchange chromatography was carried out in a column (internal diameter of 1.1 cm and a bed length of 13 cm) filled with Dowex 50W-X8/400 mesh resin from Sigma Aldrich (Figure 2).

The procedure described by Vorster et al. (2008) employing EDTA as eluent was used as a starting point. After pretreatment and resin conditioning, sample is introduced in the column, and sequential elution of Ca, Sr and Rb is performed with EDTA solutions. Experimental conditions, namely pretreatment and resin conditioning, volume and concentration of EDTA solution used at each elution step, and resin washing, were optimized in order to obtain Sr and Rb separation in a single separation step. All experimental tests were conducted using soil samples, grape must and wine, after HPMW digestion and dilution with 0.1% HNO_3 to a specific volume depending of the required concentration. Soil samples were treated as previous described. Grape must and wine samples were mineralized by an adaptation of HPMW procedure previously optimized by Catarino et al. (2010). Ammonia (NH_3), 25% (v/v), EDTA Tritiplex III, both from Merck, and purified water (conductivity < 0.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$) were used in the studies. To prevent the precipitation of residual EDTA in the instrument samples were filtered using a Millipore PVDF 0.45 μm , 3 cm of diameter syringe filter.

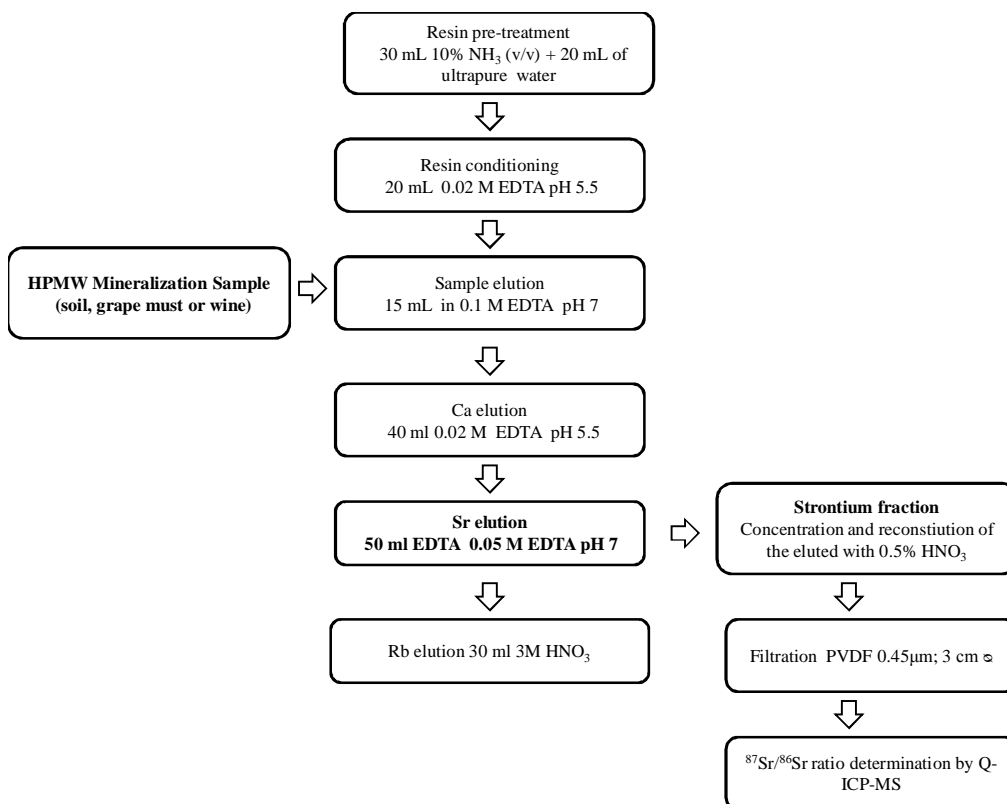


Figure 2. Strontium from rubidium ion exchange separation procedure scheme

Determination of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio by ICP-MS

A Perkin Elmer Elan 9000 ICP-MS instrument (Perkin Elmer SCIEX), equipped with a cross-flow nebulizer, a double-pass spray chamber made of Rytan (Scott-type), a quartz torch, nickel cones and a peristaltic sample delivery pump with four channels, model Gilson, was used. The ICP-MS instrument was controlled by the software Elan – 6100 Windows NT (version 2.4). The operating conditions, daily optimized as previously described by Catarino et al. (2006), were as follows: RF power of 1200 W; Ar gas flow rates of 15 L/min for cooling, between 0.94 and 0.98 L/min for nebulizer and 1.5 L/min for auxiliary; solution uptake rate, 1.0 mL/min). Between samples or standard, the sampling system was rinsed with a 2% HNO₃ solution for 120 s. As residual Rb can still be present in the pre-treated samples (MW digestion and chromatographic separation) both mathematical correction for the ^{87}Rb interference on ^{87}Sr ($-0.385617 \times ^{85}\text{Rb}$) and mathematical correction for the ^{86}Kr on ^{86}Sr ($1.505657 \times ^{83}\text{Kr}$) were systematically carried out using the software of the equipment. In order to determine $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ accurately, the SRM 987 (SrCO₃) from National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, USA) (NIST) was used as an isotopic reference material for correction of the instrumental mass bias (certified value: 0.71034 ± 0.00026). The measurement of the ^{87}Sr isotope suffers interference by the ^{87}Rb isotope. The influence

of Rb was assessed by adding defined amounts of Rb to a 25 $\mu\text{g/L}$ Sr solution and by determining $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratios. ICP-MS instrumental parameters were optimized, with the Sr isotopic standard (50 $\mu\text{g/L}$), in order to obtain the best precision for $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ measurement, and therefore allowing the detection of small variations in the ratio and distinguish between samples from different origins. The influence of the instrumental parameters: number of replicates (between 3 and 8), dwell time (between 10 and 60 ms) and number of sweeps per reading (between 100 and 1000), was studied.

4.2.4. Data analysis

The statistical treatment of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratios of the soils was performed using software Statistica vers.7 (StatSoft, Inc., Tulsa, Ok 74104, USA). Differences were tested through an analysis of variance followed by Fisher Least Significant Difference (LSD) test. Significance was tested at $\alpha=0.05$ ($p<0.05$).

4.3. Results and discussion

4.3.1. Strontium from rubidium separation by ion exchange chromatography

In order to overcome the lack of specificity of the resin for Sr, a pre-treatment step with 30 mL of 10% NH_3 (v/v) for resin particles conversion in NH_4^+ form, followed by the removal of excess NH_3 with 20 mL of ultrapure water, was established. A volume of 20 mL of a 0.02 M EDTA (pH 5.5) solution was used to equilibrate and adjust the pH of the column (conditioning step). By applying the correct concentration of EDTA, at a suitable pH for complex formation, cations can be eluted from column (Vorster et al., 2008). Soil samples, grape must and wine contain high concentration of cations which can saturate the resin causing a loss of Sr. To avoid this situation, samples were diluted in 1:25 in 0.1 M EDTA solution (1 mL final volume). As cations bind to EDTA rather than the resin, they can selectively be removed from the column. The sample solution at pH 5 was introduced into the column being cations retained in the resin. During the first elution, with 40 mL 0.02 M pH 5.5 EDTA, Ca was removed. At the second step of elution, with 50 mL of a 0.05 M pH 7 EDTA, Sr was removed. At this stage, the column was washed with 40 mL of ultrapure H_2O to remove the excess of EDTA. Since EDTA does not form chelates with alkali metals the Rb still remains in the column. The elution of this element was carried out with 40 mL of 3 M HNO_3 solution, following the removal of EDTA with deionized water. The Sr fraction is evaporated to dryness and redissolved to contain 0.5% HNO_3 which is the suitable medium for ICP-MS sample introduction. A filtration step is crucial before the sample introduction

into the instrument in order to prevent EDTA precipitate deposits in the spray chamber and obstruction of the nebulizer.

4.3.2. Accuracy and precision of the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ measurement by ICP-MS

In order to achieve the required precision, the instrumental measuring parameters were optimized using a 50 $\mu\text{g/L}$ strontium standard solution. Mass discrimination was corrected using a solution of 50 $\mu\text{g/L}$ strontium reference material NIST SMR 987.

The acquisition parameters for the measurement of the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ are given in Table 2.

Table 2. Optimized ICP-MS instrumental parameters for the measurement of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in wine, grape must and soil samples.

Parameter	Settings
Scanning mode	peak hopping
MCA channels	1
	30 ms (^{86}Sr)
Dwell time	35 ms (^{87}Sr)
	20 ms (^{88}Sr)
Sweeps/Reading	500
Reading/replicate	1
Replicates	3
Time per run	247 s

The precision of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ measurement proved to be not related to Sr concentration (10-50 $\mu\text{g/L}$), being in the range of 0.1-0.2% RSD. This precision is similar or slightly better to that obtained by several authors using a similar mass separator device (Q-ICP-MS) (Almeida and Vasconcelos, 2001; Vorster, 2008).

As previously referred, mass bias correction was carried out with a Sr isotopic standard solution. Throughout the several studies, the generated correction factor (automatically calculated) ranged between 1.020197 and 1.025118. It was observed that 1 $\mu\text{g/L}$ of Rb in 25 $\mu\text{g/L}$ Sr solution could influence the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio, causing values higher than the real. The instrumental stability during measurements was investigated by repeating the analysis of a 50 $\mu\text{g/L}$ Sr solution and no drift effect was observed. Nevertheless, periodical

calibration between samples was established. Since the developed application of this method to one's sample discrimination is based on relative differences between samples and not on absolute ratios its success is more dependent on the method precision than on accuracy.

4.3.3. $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in soils from Portuguese Denominations of Origin

The $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ determination in soil samples, from different Portuguese DO, was performed by application of the analytical protocol previously optimized (chromatographic separation of Sr from Rb, followed by ICP-MS analysis). For quality control purposes, the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ of the SRM 987 was determined regularly.

In order to prevent that residual Rb remains less than 1% of the Sr content in Sr fraction after ion-exchange separation, and therefore verify the efficiency of the chromatographic separation, the concentration of the Rb and Sr in this solution were determined previously to the isotopic measurements. The Rb was successfully removed and its contents in the samples have a minimal contribution to the ratio $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ measurements. Precision of Sr isotope ratio measurements, expressed as RSD (%), changed between 0.04 and 0.23. Although such precision is poor compared to that provided by TIMS, it was sufficient to differentiate variations of the isotopic abundance in soil samples.

For each vineyard, total Rb and Sr concentration, Rb and Sr concentrations ratio, Rb and Sr levels in Sr chromatographic fraction and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio, are shown in Table 3. In addition, Table 4 shows the LSD test P-values for the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio of the different vineyards and DO.

Regarding the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio, significant differences were found between soils from different regions. The soil samples from Óbidos region share the same $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio (0.714) and are significantly different from soils of Dão and Palmela regions (0.737 and 0.711, respectively).

The lowest values of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio and Rb content were observed in the soil of Palmela region, developed on the youngest parent material of the vineyards/DO considered in this study.

The Dão region $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio is distinctively higher than in the other regions, and is in agreement with values reported for granitic rocks of the same region (Costa, 2006). This value is in accordance with the results found by Almeida and Vasconcelos (2004) for one soil (0.732) and wines (0.729) from Douro DO, mainly schistous region, located in the northeastern Portugal. According to the literature (Costa, 2006), high $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ values are characteristic of granitic and therefore older rocks.

Table 3. Soils from Portuguese DO vineyards: identification, classification, total Rb and Sr concentration, Rb/Sr, Rb and Sr levels in strontium chromatographic fraction and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio. Means followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 level of significance

Vineyard/ Portuguese DO	Soil Classification	Soil			Sr fraction after ion-exchange separation		$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$
		Sr (ug/g)	Rb (ug/g)	Rb/Sr	Sr (ug/L)	Rb (ug/L)	
Quinta dos Carvalhais/Dão	Dystric Cambisols/Regosols from monzonitic granites	34±3	323±28	9.5	29	0,4	0.737±0.0017 c
Quinta do Sanguinhal/Óbidos	Dystric Regosols from Jurassic sandstones	50±7	176±34	3.5	50	0,5	0.714±0.0011 b
Quinta de S.Francisco/Óbidos	Eutric Regosols from Cretaceous sandstones	54±3	179 ±9	3.3	41	0,2	0.714 ±0.0010 b
Vinha de Algeruz/Palmela	Eutric Regosols from Pliocene clayed sands	52±7	141±27	2.7	55	0,4	0.711±0.0003 a
NIST SMR 987					Measured value:	0.710 ±0.00054	
					Certified value:	0.71034±0.00026	

The results show that Rb/Sr ratio is a good indicator of the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ values and level of similarity between soils of these vineyards. Considering the evolution of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ in geologic systems, in general older rocks such as granites in continental crust with higher Rb/Sr ratios will develop a higher $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ than younger ones with lower Rb/Sr (Capo et al. 1998). Dão have the higher Rb/Sr, the two vineyards from Óbidos have both similar Rb/Sr and Palmela show the lowest values for two ratios, these values are in agreement with the obtained for $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$.

Table 4: LSD test *P-values* for the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio of the different vineyard and DO regions

Vineyard/ DO	P-value
Quinta dos Carvalhais / Dão vs Quinta do Sanguinhal / Óbidos	0,000000
Quinta dos Carvalhais / Dão vs Quinta de S.Francisco / Óbidos	0,000000
Quinta dos Carvalhais / Dão vs Vinha de Algeruz / Palmela	0,000000
Quinta do Sanguinhal / Óbidos vs Quinta de S.Francisco / Óbidos	0,579584
Quinta do Sanguinhal / Óbidos vs Vinha de Algeruz / Palmela	0,003171
Quinta de S.Francisco / Óbidos vs Vinha de Algeruz / Palmela	0,013087

With the exception of Douro region (Almeida and Vasconcelos 2004) it was not found in the literature any reference to the strontium isotopic composition concerning vineyard soils from Portugal. In this study $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ values for three major DO regions, Dão, Óbidos and Palmela were assigned, with the specific purpose to discriminate between vineyards soils from different regions.

The $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio may represent a suitable fingerprint for the studied DO and may be used in conjunction with other tracers. In previous study (Catarino et al. 2011) within the referred research program, the potentialities of rare earth elements (REE) patterns as fingerprint for origin authentication were studied. Regarding the vineyards/DO of the present study, it was shown that REE patterns can represent a suitable fingerprint for wine origin authentication.

4.4. Conclusions

The developed analytical protocol for $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ determination in soil wine-system by Q-ICP-MS showed sufficient precision and accuracy to allow differentiates variations of the isotopic abundance in soil samples. The optimized ion-exchange separation method using the complexing properties of EDTA could reliably be used to separate Sr from Rb. This study updates the scarce knowledge available on $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratios in Portuguese vineyard soils. Significant differences between soils from the Portuguese DO Dão, Óbidos and Palmela were found. Despite of being developed on geologically differentiated materials, the soils from the vineyards of Óbidos DO showed identical Sr isotope ratios, demonstrating the suitability of $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ as fingerprint for this DO. The $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ratio has confirmed to be a possible tool for provenance identification for these three Portuguese DO regions.

In this study, for each DO the most representative lithological formations were considered. Studies using the $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ should be extended to other lithological situations of these DO, in order to characterize each region, and to other Portuguese DO. This information may integrate an international wine databank to along with others parameters aiming to be used as tool for geographic identification and authentication. Finally, in the future it would be necessary to gather more information regarding the wine and geological and pedological background.

4.5. Acknowledgments

The present study was developed within the project “Multi-elemental and isotopic composition as fingerprints of wine geographical origin” (PTDC/AGR-ALI/64655/2006) funded by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia. Authors like to acknowledge the wine companies “Companhia Agrícola do Sanguinhal Lda”, “José Maria da Fonseca Vinhos” and “Sogrape Vinhos” for providing facilities regarding project development. Paulo Marques and José Correia are acknowledged for helping field samplings, the staff of Soil Laboratory (ISA) for soil analysis, and Otilia Cerveira for helping Mineral Analysis Laboratory activities (INIAV).

4.6. References

- Almeida, C.M. and Vasconcelos, M.T.S.D. (2001). ICP-MS determination of strontium isotope ratio in wine in order to be used as fingerprint of its regional origin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16, 607-611.
- Almeida, C.M. and Vasconcelos, M.T.S.D. (2003). Multi-element composition and $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ of wines and their potentialities as fingerprints of wine provenance. *Ciência e Técnica Vitivinícola* 18 (1), 15-27.
- Almeida, C.M. and Vasconcelos, M.T.S.D. (2004). Does winemaking process does influence the wine $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$? A case study. *Food Chemistry* 85, 7-12.
- Barbaste, M. (2001). Recherches sur l'origine géographique et millésime des vins. PhD Thesis, École doctorale des sciences exactes et leur applications de Université de Pau et des Pays de L'Adour, Pau, 120 pp.
- Barbaste, M., Robinson, K., Guilfoyle, S., Medina, B. and Lobinski, R. (2002). Precise determination of the strontium isotope ratios in wine by inductively coupled plasma sector field multicollector mass spectrometry (ICP-SF-MC-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 17 (2), 135-137.
- Berglund, M. and Wieser, M. (2011). Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 83 (2), 397-410.
- Capo, R.C., Stewart, B.W. and Cadwick, O.A. (1998). Strontium isotopes tracers of ecosystems processes: theory and methods. *Geoderma* 82, 197-225.
- Catarino, S., Curvelo-Garcia, A.S. and Bruno de Sousa, R. (2006). Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma mass spectrometry: a comparison of two calibration approaches. *Talanta* 70, 1073-1080.
- Catarino, S., Trancoso, I.M., Bruno de Sousa, R. and Curvelo-Garcia, A.S. (2010). Grape must mineralization by high pressure microwave digestion for trace elements analysis: development of a procedure. *Ciência e Técnica Vitivinícola* 25 (2), 87-93.
- Catarino, S., Trancoso, I.M., Madeira, M., Monteiro, F., Bruno de Sousa, R. and Curvelo-Garcia, A.S. (2011). Rare earths data for geographical origin assignment of wine: a Portuguese case study. *Bulletin de l'OIV* 84 (965-967), 223-246.
- Costa, M.M.C.P. (2006). Geoquímica de Granitóides de Pera Velha – Vila Nova de Paiva – Ferreira de Aves. Dissertação de Mestrado em Geoquímica. Universidade de Aveiro, Aveiro.

- Faure, G. (1977). Principles of Isotope Geology. Wiley, New York.
- Ferreira, A.I.J. (2008). Espectrometria de Massa de Razões Isotópicas. PhD Thesis, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, 299 pp.
- Garcia-Ruiz, S., Moldovan, M. and Alonso, I. (2007). Measurement of strontium isotope ratios by MC-ICP-MS after online Rb-Sr ion chromatography separation. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 23, 84-93.
- Horn, P., Shaaf, P., Holbach, B., Hölz, S. and Eschnauer, H. (1992). $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ from rock and soil and vine and wine. Z Lebensm Unters Forsh 196, 407-409.
- Horn, P., Hölz, S., Todt, W. and Matthies, D. (1998). Isotope abundance ratios of Sr in wine provenance determination, in a tree-root activity stud, and of Pb in a pollution study on tree-rings. Isotopes in Environmental Health Studies 34, 31-42.
- IM (2008) Instituto de Meteorologia Portuguese Government website <https://www.meteo.pt/pt/areaeducativa/otempo.eoclima.pt/index.html> [accessed 24/11/2012].
- IUSS Working Group WRB, 2006. World Reference Base for Soil Resources 2006, vol 103. World Soil Resources Report 2nd edn. FAO, Rome.
- Manuppella, G., Antunes, M. T., Pais, J., Ramalho, M. e Rey, J. 1999. Carta Geológica de Portugal na escala de 1:50 000. Notícia Explicativa da Folha 38 B – Setúbal. Instituto Geológico e Mineiro. Lisboa.
- Rosner, M. (2010). Geochemical and instrumental fundaments for accurate and precise strontium isotope data of food samples: Comment on “Determination of the strontium isotope ratio by ICP-MS gingeng as a tracer of regional origin” (Choi et al, 2008). Food Chemistry 121, 918-921.
- Rummel, S., Hoelz, S., Horn, P., Rossman, A. and Schlicht, C. (2008). The combination of stable isotope abundance ratios of H, C, N and S with $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ for geographical origin assignment of orange juices. Food Chemistry 118, 890-900.
- Stewart, B., Capo, R. and Chadwick, O. (1998). Quantitative strontium isotope models for weathering, pedogenesis and biogeochemical cycling. Geoderma 82, 173-195.
- Teixeira, C., Brito de Carvalho, L. H., Barros, R. F., Ávila Martins, J.U. and Haas, W. E. L. 1961. Carta Geológica de Portugal na escala de 1:50 000. Notícia Explicativa da Folha 17 C – Santa Comba Dão. Serviços Geológicos de Portugal. Lisboa.

Vanhaecke, F., Wannemacker, G., Moens, L. and Hertogen, J. (1999). The determination of isotope ratios by means of quadropole-based ICP-mass spectrometry: a geochronological case study. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14, 1691-1696.

Vorster, C., Walt, T.N. and Coetzee, P.P. (2008). Ion separation of strontium and rubidium on Dowex 50W-X8, using complexation properties of EDTA and DCTA. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392, 287-296.

Zbyszewsky, G. e Veiga Ferreira, O. 1966. Carta Geológica de Portugal na escala de 1:50 000. Notícia Explicativa da Folha 30 B – Bombarral. Serviços Geológicos de Portugal. Lisboa.

5. Considerações Finais

O estudo da razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ demonstrou que este parâmetro pode ser utilizado para distinguir entre solos de diferentes regiões portuguesas. Para se avaliar sua adequabilidade como marcador de origem de vinhos terá de ser reunida mais informação. É necessário caracterizar os sistemas geológicos e pedológicos das regiões onde estão implantadas as vinhas, e alargar os estudos a mais regiões. Desta forma podem ser retiradas mais conclusões sobre os fatores que influenciam a ocorrência do estrôncio e razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ no solo e aferir os valores isotópicos característicos de cada região para que possam ser integrados num banco de dados isotópicos.

É também necessário acompanhar a evolução da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ao longo da sequência biotecnológica, solos, uvas, mostos e vinho, para avaliar a forma como é afetada pelos processos de vinificação e averiguar a relação dos vinhos com os solos de origem.

Um único parâmetro analítico na maioria dos casos não é suficiente para fazer prova da autenticidade. A assinatura isotópica do Sr combinada com outros parâmetros aumenta o rigor da avaliação. Exemplo disso são os resultados obtidos no âmbito do projeto de investigação em que se insere este trabalho, relativamente aos perfis de distribuição dos elementos terras raras. Para as mesmas amostras de solos usadas neste estudo, também a determinação dos perfis de $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ terras raras distingue entre os solos das regiões Dão, Óbidos e Palmela, e evidenciam as similaridades entre os dois solos da região de Óbidos. Também no âmbito deste estudo foram igualmente identificados outros indicadores tais como os elementos Cs, Li, Rb e Sr que discriminam as três regiões.

Uma abordagem com muito interesse é a combinação da razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ com as já utilizadas razões isotópicas $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$. Em termos de identificação geográfica a razão isotópica $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ possui um âmbito de aplicação diferente das razões $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, o que pode dar um grande contributo para a avaliação da autenticidade. Numa situação em que as amostras oriundas de diferentes regiões dentro da mesma zona climática possuem razões de $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ semelhantes, o conhecimento da razão $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ acrescenta resolução geográfica com base na litologia e geoquímica dos solos.